

烏魚中雌激素多重殘留分析方法建立及應用

陳慧珊¹、陳鴻基²、徐慈鴻^{1*}

摘要

陳慧珊、陳鴻基、徐慈鴻。2020。烏魚中雌激素多重殘留分析方法建立及應用。臺灣農藥科學 9 : 55-75。

本研究應用液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS)，建立烏魚(烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢) 中雌酮 (Estrone, E1)、17 α -雌二醇 (17 α -Estradiol, 17 α -E2)、雌二醇 (Estradiol, E2)、雌三醇(Estriol, E3)、己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES)、乙炔雌二醇 (Ethinylestradiol, EE) 及苯甲酸雌二醇 (Estradiol benzoate, EB) 等 7 種雌激素之殘留檢驗技術。於烏魚 (烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢) 中分別添加三濃度進行三重複回收率試驗，以 QuEChERS 方法萃取淨化後，所得檢液再以 LC-MS/MS 進行定性與定量分析。7 種雌激素之平均回收率測試結果，烏魚肉中為 67~116%，烏魚肝中為 61~113%，烏魚卵巢中為 60~99%，所有平均回收率之變異係數皆 <20%，定量極限在烏魚肉為 0.002 mg/kg，烏魚肝為 0.005 mg/kg 及烏魚卵巢為 0.005 mg/kg，顯示所建立之檢驗方法可應用於烏魚中雌激素殘留之監測，應用本方法於海生烏魚及洄游烏魚雌激素含量調查，包含烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢，其結果可提供為海生烏魚及洄游烏魚中雌激素之種類及背景值含量，以作為後續研究應用之參考。

關鍵詞：烏魚、雌激素、液相層析串聯質譜儀

緒言

烏魚為底棲性魚類，喜棲息在入海口，產卵期時會洄游至外海產卵，孵化後

幼魚溯河入淡水河川⁽¹⁵⁾，圍捕作為養殖之天然魚苗，臺灣烏魚魚苗之供應目前為天然魚苗，隨著產業發展，加上配合飼料之開發，烏魚養殖方法已由粗放式混養進步到集約式養殖，集約式養殖業以嘉義、

接受日期：2021 年 1 月 29 日

* 通訊作者。E-mail: ths@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

² 臺中市 國立中興大學

臺南為主要地區，彰化、雲林多在文蛤池中混養者居多數，而烏魚養殖可分成兩部分，一為飼養約一年之烏魚，供應市場銷售或作為抱卵烏魚養殖；二為抱卵烏魚養成，抱卵烏魚出售之魚齡可分成三年烏與二年烏⁽³⁾。每年冬至前後烏魚會順著中國沿岸流往南洄游至臺灣南部，漁民在此時期進行捕撈並將烏魚卵巢加工製成高單價之烏魚子販售，國內烏魚產值至少破億元，惟因海洋環境變化致野生烏魚數量年間波動大，供給不穩定，幸賴烏魚養殖技術日漸純熟，養殖烏魚子已逐步替代海洋捕撈烏魚子⁽⁵⁾，文獻顯示養殖初期投餵含有添加雌激素之飼料，可提升雌性烏魚之比例⁽⁴¹⁾。為維繫我國養殖烏魚產業之應用發展，爰建立雌激素藥劑檢驗技術，提升雌激素之靈敏度及準確度，針對國內海生烏魚（含洄游烏魚，特指冬至前後產卵洄游至臺灣海峽之烏魚。）所含之雌激素種類及含量進行分析調查，以釐清民眾疑慮，提升水產食品食用安全。

雌激素 (Estrogen) 是一類女性荷爾蒙，主要由卵巢、黃體和胎盤產生，少量的雌激素則經由其他組織合成，如肝、腎上腺皮質及乳房，另男性的睪丸也會分泌少量雌激素。雌激素於生物體內之主要作用為促進女性性徵的發育成熟，同時調節其生長與發展^(2, 37)。而類雌激素 (Xenoestrogen) 則具有模擬雌激素於內分泌系統上之作用，造成生物體於生殖方面上之損害^(19, 40)。類雌激素包含天然雌激素與具有雌激素特性之人工合成化合物

等。天然雌激素之來源主要為內分泌系統所產生之物質，來自生物體所產生之雌激素主要有雌酮 (Estrone, E1)、雌二醇 (Estradiol, E2)、及雌三醇 (Estriol, E3) 等，生物體內雌激素的生物合成與代謝途徑相當複雜，其中雌二醇為卵巢分泌之主要雌激素，而雌酮與雌三醇為雌二醇之主要代謝物⁽²⁾。另外，己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES)、乙炔雌二醇 (Ethinylestradiol, EE) 及苯甲酸雌二醇 (Estradiol benzoate, EB) 為人工合成雌激素化合物，能產生與天然雌激素相同的藥理與治療作用，是口服避孕藥及治療女性疾病藥物之主要成分。動植物防疫檢疫局動物用藥品資訊服務網中指出，苯甲酸雌二醇可用於治療牛、馬、豬、羊、犬、貓、兔雌性生殖器官之發育及功能⁽¹⁾。衛生福利部動物用藥殘留標準及食品法典委員會 2015 年第二次會議指出，雌二醇於家畜類中得免訂容許量^(9, 16)。

目前檢測雌激素的方法可分為生物性及化學性分析方法，生物性分析方法有酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)^(20, 24, 43) 及放射性免疫法 (radioimmunoassay; RIA)，因其受限於是否有特定的抗血清，以及交叉反應 (cross-reaction) 的干擾，所以較不常被使用⁽¹⁰⁾，廣泛使用的方法是化學性分析方法，包括高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^(25, 27, 34, 35)、氣相層析串聯質譜儀 (gas chromatograph/tandem mass spectrometer，

GC-MS/MS)^(14, 24, 28, 29, 46) 和液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)^(7, 13, 17, 22, 28, 32, 48, 50) 分析之方法，高效液相層析法選擇性和靈敏度低，氣相層析串聯式質譜儀分析法需衍生化程序複雜且耗時，液相層析串聯質譜儀分析法之分析速度快且具備高靈敏度，降低干擾物提升檢測之專一性，其定性和定量分析準確性高。本研究參考歐盟 QuEChERS 方法^(12, 26)，以液相層析串聯質譜儀提升雌激素檢測之靈敏度及準確度，開發 7 項雌激素之多重殘留分析方法。

材料與方法

一、樣品來源

(一) 海生烏魚：

2019 年 10 月由國立臺灣海洋大學自雲林口湖採集 20 件的海生烏魚樣品；海生烏魚樣品再細分為海生烏魚肉 20 件、海生烏魚肝 20 件及海生烏魚卵巢 20 件。

(二) 洄游烏魚：

2019 年 12 月由國立臺灣海洋大學自彰化採集 20 件的洄游烏魚樣品；洄游烏魚樣品再細分為洄游烏魚肉 20 件、洄游烏魚肝 20 件及洄游烏魚卵巢 19 件。

總計樣品分別為烏魚肉 40 件、烏魚

肝 40 件及烏魚卵巢 39 件。

二、試藥

乙腈及甲醇均採層析級；氟化鉍採用分析級；純水 (比電阻於 25°C 可達 18 MΩ/cm 以上)；雌激素對照用標準品 7 項，包括雌酮 (Sigma-Aldrich, 99%)、17 α -雌二醇 (Sigma-Aldrich, 98%)、雌二醇 (Sigma-Aldrich, 98%)、雌三醇 (Sigma-Aldrich, 99.3%)、己烯雌酚 (Sigma-Aldrich, 99%)、乙炔雌二醇 (Sigma-Aldrich, 98%) 及苯甲酸雌二醇 (USP, 100%)。

三、標準溶液配製

取雌激素對照用標準品，各約 10 mg，精確稱定，以甲醇溶解並定容至 100 mL，作為標準原液 (stock solution, 100 mg/L)，避光於 18°C 貯存備用。臨用時精確量取適量標準原液，以甲醇稀釋至 0.002~0.2 mg/L，供作標準溶液。

四、檢液之調製

量取經過處理之待測樣品，精秤 10 g 於 50 mL 離心管中，若為魚肝、魚卵巢則精秤 2 g，添加 10 mL 的乙腈，再加入陶瓷均質石 1 顆，蓋上離心管蓋並以試管振盪器劇烈振盪 2 分鐘，再加入 6.5 g 的緩衝—鹽混合劑 (QuEChERS Extract Tubes,

EN Method, Agilent, 5982-5650), 蓋上離心管蓋並劇烈振盪 2 分鐘進行二次萃取及鹽析分層, 於 15°C 以 3,000 xg 離心 5 分鐘, 取上層之澄清液 6 mL, 移至淨化離心管 (Dispersive SPE 15 mL, Fatty Samples, EN, Agilent, 5982-5156) 中, 劇烈振盪 2 分鐘, 並於 15°C 以 3,000 xg 離心 5 分鐘, 取上層液供作檢液原液。量取 1 mL 的檢液原液至另一玻璃試管, 將檢液原液以吹氮濃縮裝置吹至微乾後加入 1 mL 的甲醇定量, 若為魚肝及魚卵巢則吹至微乾後加入 0.5 mL 的甲醇定量, 混合均勻後再以濾膜 (0.2 μ m, PTFE, 13mm) 過濾, 供作檢液, 進行液相

層析串聯質譜儀分析, 方法詳見 (圖一)。

五、基質匹配檢量線製備

取空白樣品, 依檢液之調製後量取 1 mL 檢液原液, 以吹氮濃縮裝置吹至剛乾, 分別加入 0.002~0.2 mg/L 標準溶液 1 mL, 若為魚肝及魚卵巢則分別加入 0.002~0.2 mg/L 標準溶液 0.5 mL, 混合均勻, 供作基質匹配檢量線溶液, 製作濃度至少五種不同濃度, 以自動注入器注入適當體積由各待測物所得之波峰面積 (Peak Area), 執行檢量線製作並確定其線性相關。



圖一、雌激素之多重殘留流程圖。

Fig. 1. Flowchart illustrating estrogen residue analysis.

六、分析儀器

樣品依方法調製檢液後，以液相層析串聯質譜儀 (Agilent 1290/6470, LC-MS/MS) 分析，其儀器條件如下：(1) 離子源：電灑游離 (electrospray ionization, ESI)，(2) 層析管柱：Poroshell 120 PFP，長度 100 mm，內徑 3.0 mm，粒徑 2.7 μm ；層析管柱溫度：40°C，(3) 保護管柱：Poroshell 120 PFP，長度 5 mm，內徑 3 mm，粒徑 2.7 μm ，(4) 移動相溶液 A：精秤 0.37 g 氟化銨，以 1,000 mL 純水充分溶解後，以 0.2 μm 濾膜過濾，取濾液作為移動相溶液 A 備用，以 0.2 μm 濾膜過濾備用；移動相溶液 B：乙腈；移動相流速為 0.3 mL/min；移動相梯度變化見 (表一)，(5) 注入體積：5 μL ，(6) 毛細管電壓 (capillary voltage)：正離子掃描為 4 kV，

負離子掃描為 3.5 kV，(7) 離子源溫度 (ion source temperature)：300°C，(8) 溶媒揮散氣體流速：40 psi，(9) 碰撞氣體壓力：2 mL/min，(10) 偵測模式：多重反應偵測 (multiple reaction monitoring, MRM) 正負離子模式，各待測物檢驗時之儀器設定參考條件詳見 (表二)。

表一、移動相流速及梯度變化

Table 1. Flow gradients for mobile phases of LC

Time (min)	Flow (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	0.3	70	30
2	0.3	70	30
5	0.3	40	60
10	0.3	20	80
12	0.3	10	90
14	0.3	10	90

表二、質譜儀分析條件

Table 2. MS/MS fragmentation conditions

Compound name ¹⁾	ESI mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Fragment (V)	Quantification		Identification	
				Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
Estrone	ESI ⁻	269.1	196	145.2	33	159.2	33
17 α -Estradiol	ESI ⁻	271.2	196	145.1	40	183.2	40
Estradiol	ESI ⁻	271.2	196	145.1	40	183.2	40
Estriol	ESI ⁻	287.2	196	171.2	38	145.1	38
Diethylstilbestrol	ESI ⁻	267.1	124	237.2	25	251.0	21
Ethinylestradiol	ESI ⁻	295.2	196	145.0	45	159.3	33
Estradiol benzoate	ESI ⁺	377.2	144	104.9	17	76.9	65

¹⁾ Estrone：E1，雌酮；17 α -Estradiol：17 α -E2，17 α -雌二醇；Estradiol：E2，雌二醇；Estriol：E3，雌三醇；Diethylstilbestrol：DES，己烯雌酚；Ethinylestradiol：EE，乙炔雌二醇；Estradiol benzoate：EB，苯甲酸雌二醇。

七、鑑別試驗及含量測定

(一) 檢液定性測定

以基質匹配檢量線進行層析儀分析，各待測物之滯留時間、定量離子、定性離子等參數作為檢液中所含待測物種類之定性依據，檢液中所檢出待測物之滯留時間與基質匹配檢量線其差異需在 0.4 min 以內，且符合 (表三) 所列條件者方需進行定量測定。

(二) 檢液定量測定

經定性確認者，由基質匹配檢量線所得的線性迴歸曲線 $y=mx+n$ 求出檢液中各待測物之濃度 (mg/L) (C)，再依下列計算式求得待測樣品中各待測物之含量 (mg/kg ; ppm)。

待測樣品中各待測物之含量 (mg/kg ; ppm) = $C \times V \times F / M$

C：由各待測物基質匹配檢量線求得檢液中各待測物之濃度 (mg/L)

V：檢液最後定容之體積 (mL)

F：乙腈加入體積 / 檢液原液量取體積

M：待測樣品之重量 (g)

八、回收率試驗

將適量之待測物標準品添加於空白樣品中，依檢驗方法分析步驟，分別進行烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢中三種濃度三重

複之回收試驗，加以定量求出其回收率 (Recovery, R%) 及計算三重複試驗之變異係數 (coefficient of variation, CV)，方法確效評估依據食品化學檢驗方法之確效規範⁽⁸⁾，依樣品所含待測物之濃度，其回收率應介於 70~120% (濃度範圍 > 0.01~1 ppm) 或 65~125% (濃度範圍 > 0.001~0.01 ppm)，且其變異係數小於 20%。

九、基質效應 (Matrix effect, ME)

取空白樣品，依檢液之調製後量取 1 mL 檢液原液，以吹氮濃縮裝置吹至剛乾，加入 0.05 mg/L 標準溶液 1 mL，若為魚肝及魚卵巢則加入 0.05 mg/L 標準溶液 0.5 mL，混合均勻，供作基質效應之檢液，以自動注入器注入適當體積由各待測物所得之波峰面積 (Peak Area)，比較其和等量純待測物標準品的訊號，各進行 3 重複之檢測，定量地描述前處理與層析方法時之基質效應，其基質效應以下列公式進行量化⁽³⁶⁾：

表三、相對離子強度之最大容許範圍 (2002/657/EC)⁽³⁹⁾

Table 3. Maximun permitted tolerances for relative ion intensities (2002/657/EC)

Relative intensity (% of base peak) ¹⁾	Relative (%)
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
> 10 ~ 20	± 30
≤ 10	± 50

¹⁾ 相對離子強度 (%) 由定性離子波峰面積除以定量離子波峰面積再乘以 100% 而得 (≤100 %)

$ME (\%) = A(\text{Extract})/A(\text{Standard}) \times 100-100$

A (Extract)：基質效應之檢液中各待測物之波峰面積

A (Standard)：標準溶液中各待測物之波峰面積

十、定量極限 (limit of quantitation, LOQ)

依照本研究的萃取及淨化方式，於均質的空白樣品中，添加定量極限之標準溶液，配製 3 個樣品，經液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 檢測，且強度之訊噪比 (S/N) 大於 10 以上。

結果與討論

一、雌激素多重殘留分析方法建立

(一) LC-MS/MS 分析條件

本研究以 LC-MS/MS 作為分析儀器，依據雌激素之性質，選擇以正離子模式或負離子模式來進行分析，詳見表二，以 LC-MS/MS 正／負離子模式同時分析 7 種雌激素，於移動相中添加鹼性溶液如氟化銨增加其靈敏度，在正離子模式下增強游離化的效率，在負離子模式下幫助分析物去質子化提高靈敏度^(21, 42, 45, 47, 49)，本研究以乙腈與去離子水搭配 0.01M 氟化銨水溶液作為移動相，流速為 0.3 mL/min，可

於 14 分鐘內完成分析，(圖二) 為 E1、17 α -E2、E2、E3、DES、EE 及 EB 濃度 0.05 mg/L 之 MRM 圖譜。

(二) 檢量線與定量極限

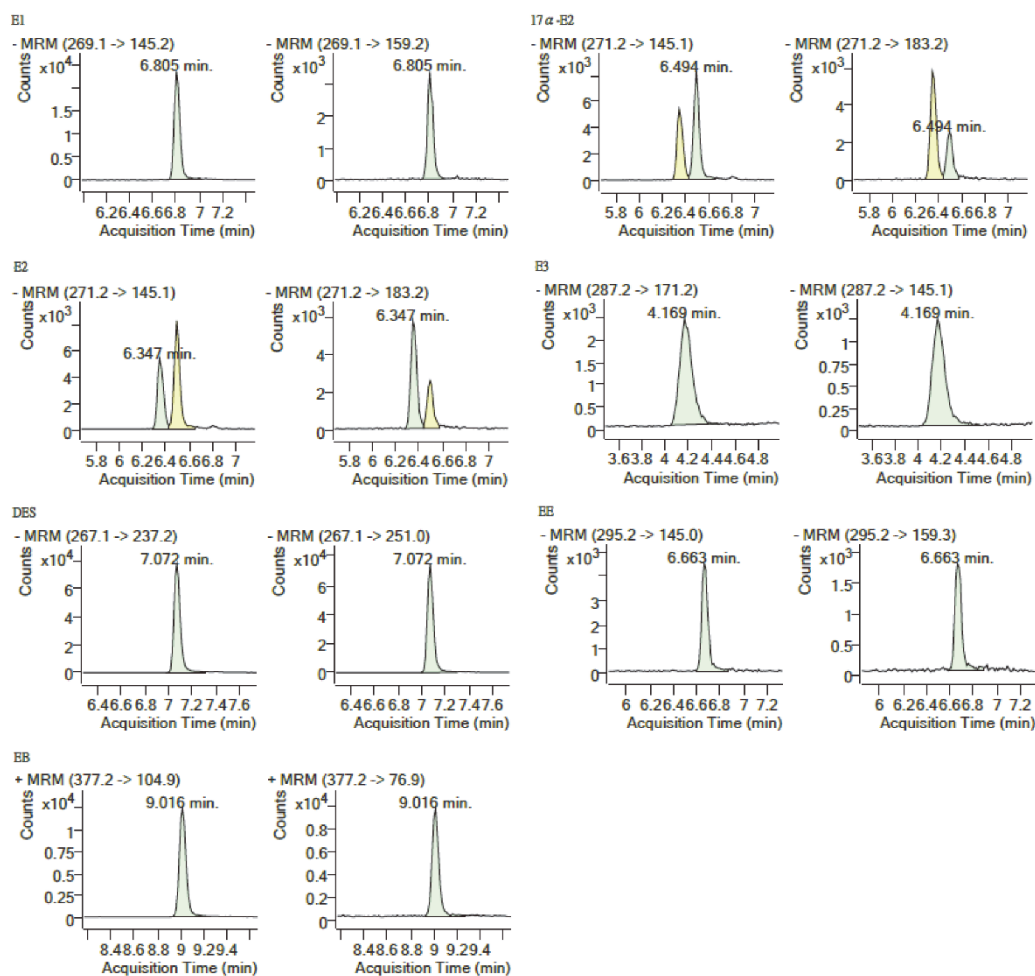
本研究以基質匹配檢量線來執行檢量線製作並確定其線性相關，製作濃度至少五種不同濃度，7 種雌激素之檢量線範圍於不同基質中分別為：烏魚肉為 0.002~0.2 mg/kg，烏魚肝為 0.005~0.5 mg/kg 及烏魚卵巢為 0.005~0.5 mg/kg，7 種雌激素之線性相關係數 (correlation coefficient) r 於不同基質中分別為：烏魚肉為 0.9989~0.9999，烏魚肝為 0.9997~0.9999 及烏魚卵巢為 0.9995~0.9998，皆具有良好的線性關係，其 r 皆 >0.995。依照本研究的萃取及淨化方式，於均質的空白樣品中，添加定量極限之標準溶液，配製 3 個樣品，經液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 檢測，且強度之訊噪比 (S/N) 大於 10 以上，其定量極限 (limit of quantitation, LOQ) 於烏魚肉為 0.002 mg/kg，烏魚肝為 0.005 mg/kg 及烏魚卵巢為 0.005 mg/kg，詳見 (表四~表六)。

(三) 回收率試驗之結果

本研究參考歐盟 QuEChERS 方法^(12, 26)，建立烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢中 7 種雌激素之檢驗方法，方法流程見圖一，方法確效則分別進行烏魚肉、烏魚肝及烏

魚卵巢中三種濃度 (低中高) 三重複之回收試驗，加以定量求出其回收率 (Recovery, R%) 及計算三重複試驗之變異係數 (coefficient of variation, CV)，添加雌激素 (0.005 mg/kg、0.01 mg/kg 和

0.05 mg/kg) 於烏魚肉的空白樣品中，其樣品中的平均回收率為 67~116%，重複性試驗之變異係數 (CV) 在 1~12%間，添加雌激素 (0.0125 mg/kg、0.025 mg/kg 和 0.125 mg/kg) 於烏魚肝的空白樣品中，其



圖二、7 種雌激素 0.05 mg/L 之 MRM 圖譜。

Fig. 2. MRM chromatograms of 7 estrogen at 0.05 mg/L.

Estrone : E1 , 雌酮 ; 17 α -Estradiol : 17 α -E2 , 17 α -雌二醇 ; Estradiol : E2 , 雌二醇 ; Estriol : E3 , 雌三醇 ; Diethylstilbestrol : DES , 己烯雌酚 ; Ethinylestradiol : EE , 乙炔雌二醇 ; Estradiol benzoate : EB , 苯甲酸雌二醇。

表四、烏魚肉中雌激素之線性相關係數與定量極限

Table 4. Correlation coefficient and limit of quantitation for estrogen in aquaculture mullet muscle

Compound name	Calibration range (mg/kg)	Correlation coefficient	LOQ (mg/kg)
Estrone	0.002 ~ 0.2	0.9999	0.002
17 α -Estradiol	0.002 ~ 0.1	0.9993	0.002
Estradiol	0.002 ~ 0.2	0.9999	0.002
Estriol	0.002 ~ 0.1	0.9998	0.002
Diethylstilbestrol	0.002 ~ 0.1	0.9998	0.002
Ethinylestradiol	0.002 ~ 0.2	0.9998	0.002
Estradiol benzoate	0.002 ~ 0.1	0.9989	0.002

表五、烏魚肝中雌激素之線性相關係數與定量極限

Table 5. Correlation coefficient and limit of quantitation for estrogen in mullet liver

Compound name	Calibration range (mg/kg)	Correlation coefficient	LOQ (mg/kg)
Estrone	0.005 ~ 0.5	0.9999	0.005
17 α -Estradiol	0.005 ~ 0.5	0.9999	0.005
Estradiol	0.005 ~ 0.25	0.9999	0.005
Estriol	0.005 ~ 0.5	0.9999	0.005
Diethylstilbestrol	0.005 ~ 0.5	0.9997	0.005
Ethinylestradiol	0.005 ~ 0.5	0.9997	0.005
Estradiol benzoate	0.005 ~ 0.5	0.9999	0.005

表六、烏魚卵巢中雌激素之線性相關係數與定量極限

Table 6. Correlation coefficient and limit of quantitation for estrogen in mullet ovaries

Compound name	Calibration range (mg/kg)	Correlation coefficient	LOQ (mg/kg)
Estrone	0.005 ~ 0.5	0.9997	0.005
17 α -Estradiol	0.005 ~ 0.25	0.9997	0.005
Estradiol	0.005 ~ 0.5	0.9998	0.005
Estriol	0.005 ~ 0.25	0.9998	0.005
Diethylstilbestrol	0.005 ~ 0.25	0.9996	0.005
Ethinylestradiol	0.005 ~ 0.5	0.9998	0.005
Estradiol benzoate	0.005 ~ 0.5	0.9995	0.005

樣品中的平均回收率為 61~113%，重複性試驗之變異係數 (CV) 在 1~17% 間，添加雌激素 (0.0125 mg/kg、0.025 mg/kg 和 0.125 mg/kg) 於烏魚卵巢的空白樣品中，其樣品中的平均回收率為 60~99%，重複性試驗之變異係數 (CV) 在 1~10% 間，添加三種濃度於不同基質中的平均回收率，除烏魚肉中低濃度雌三醇、烏魚肝中中高濃度苯甲酸雌二醇及烏魚卵巢中中高濃度雌三醇的平均回收率介於 60~70%，

其餘皆符合確效規範 70~120%，然烏魚肉中添加低濃度 (0.005 mg/kg) 雌激素之回收試驗，則符合確效規範 60~125%，其重複性試驗之變異係數 (CV) 皆 <20%，而添加高濃度於不同基質中重複性試驗之變異係數 (CV) 皆 <15%，顯示本檢驗方法之建立，可快速準確的進行烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢中雌激素檢測之定性及定量，詳見 (表七~九)。

表七、烏魚肉中 7 種雌激素回收率測試結果

Table 7. Recovery rates for 7 estrogen in aquaculture mullet muscle

Compound name	Low concentration			Medium concentration			High concentration		
	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)
Estrone	0.005	89	5	0.01	100	4	0.05	98	2
17 α -Estradiol	0.005	86	6	0.01	95	5	0.05	94	4
Estradiol	0.005	79	11	0.01	98	3	0.05	91	1
Estriol	0.005	67	11	0.01	73	10	0.05	77	2
Diethylstilbestrol	0.005	83	4	0.01	78	7	0.05	80	4
Ethinylestradiol	0.005	100	12	0.01	110	9	0.05	97	5
Estradiol benzoate	0.005	71	6	0.01	116	2	0.05	106	3

表八、烏魚肝中 7 種雌激素回收率測試結果

Table 8. Recovery rates for 7 estrogen in mullet liver

Compound name	Low concentration			Medium concentration			High concentration		
	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)
Estrone	0.0125	86	7	0.025	94	1	0.125	87	10
17 α -Estradiol	0.0125	93	6	0.025	90	3	0.125	81	11
Estradiol	0.0125	113	2	0.025	107	3	0.125	95	6
Estriol	0.0125	75	17	0.025	73	4	0.125	70	12
Diethylstilbestrol	0.0125	93	3	0.025	84	2	0.125	84	10
Ethinylestradiol	0.0125	94	5	0.025	104	6	0.125	87	9
Estradiol benzoate	0.0125	71	12	0.025	65	1	0.125	61	5

表九、烏魚卵巢中 7 種雌激素回收率測試結果

Table 9. Recovery rates for 7 estrogen in mullet ovaries

Compound name	Low concentration			Medium concentration			High concentration		
	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)	Spike level (mg/kg)	Recovery (%)	CV (%)
Estrone	0.0125	87	6	0.025	93	4	0.125	90	1
17 α -Estradiol	0.0125	92	8	0.025	80	5	0.125	85	3
Estradiol	0.0125	95	5	0.025	78	6	0.125	84	3
Estriol	0.0125	72	10	0.025	60	8	0.125	69	2
Diethylstilbestrol	0.0125	76	1	0.025	73	7	0.125	84	0
Ethinylestradiol	0.0125	88	10	0.025	86	7	0.125	89	2
Estradiol benzoate	0.0125	99	1	0.025	87	5	0.125	86	5

(四)基質效應之評估

基質指的是樣品中待測物以外的成分，其常常對待測物的分析有顯著的干擾，並影響分析結果的準確性，本研究主要評估 LC-MS/MS 的基質效應，指層析過程中同時間進入質譜儀的其他物質，尤其是一些揮發性較低的分子，造成待測物於游離源中離子化效率不預期地產生變動，進而影響定量的結果，大多數情形以游離化被抑制為多，少數情形會增強游離化的效率^(6, 30)。為評估基質效應，分別配製烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢中 7 種雌激素 3 重複基質效應之檢液，其濃度分別為 0.05 mg/kg、0.125 mg/kg 和 0.125 mg/kg，參照公式進行量化，量化之結果若為正值則表增強，若為負值則表抑制，如基質效應微弱（增強或抑制 0~20%），可忽視基質干擾，但具中等（增強或抑制 20~50%）或

強烈（增強或抑制 >50%）基質效應，則必須使用基質匹配檢量線來克服基質的影響^(23, 33)，結果顯示雌二醇在烏魚肝基質中，其基質效應增強 25%，苯甲酸雌二醇在烏魚肉基質中，其基質效應增強 33%，但在烏魚肝及烏魚卵巢基質中，其基質效應分別抑制 70% 及 62%，其餘雌激素在不同基質中之基質效應皆小於 20%，詳見（表十）。

基質效應隨著基質之不同、待測物理化性質之不同及層析滯留時間而改變，若基質效應在樣品之間具一致性，基本上對於定量的再現性影響不大，若基質效應變動較大，可能影響結果的再現性與準確性，使用穩定同位素標定的內標準品可消除基質之影響，然若以同位素內標進行定量，其同位素標定的內標準品不易找齊，只由少數內標準品來定量多種待測物難以去除基質效應的影響，如何能一次分析多種化合物，又能將基質效應對於定量的影

表十、不同基質中雌激素之基質效應

Table 10. Matrix effects (ME) for estrogen in different matrixes

Compound name	ME (%)		
	Mullet muscle	Mullet liver	Mullet ovaries
Estrone	1	3	1
17 α -Estradiol	4	-5	4
Estradiol	-6	25	2
Estriol	1	3	4
Diethylstilbestrol	6	9	2
Ethinylestradiol	0	2	6
Estradiol benzoate	33	-70	-62

響控制於可接受的範圍，是多重殘留分析方法的一大挑戰，在無適當內標準品可用的情形下，利用相同基質添加標準品建立基質匹配檢量線進行定量，可大幅降低基質效應對定量的影響^(6, 31, 38)，本研究皆以基質匹配檢量線進行含量測定。

二、雌激素含量的調查

將此方法應用於海生烏魚及洄游烏魚雌激素含量調查，包含烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢。

(一) 海生烏魚之雌激素含量

分析 2019 年 10 月由國立臺灣海洋大學自雲林採集之 20 件海生烏魚樣品，海生烏魚樣品再細分為海生烏魚肉 20 件、海生烏魚肝 20 件及海生烏魚卵巢 20 件。

雌激素含量檢測結果顯示如下：

1. 烏魚肉：20 件海生烏魚肉樣品中皆未檢出雌激素 (< LOQ)。

2. 烏魚肝：20 件雌性海生烏魚肝樣品中有 11 件烏魚肝樣品檢測到雌激素，檢出率為 55%，檢出雌二醇含量為 0.005~0.010 mg/kg。

3. 烏魚卵巢：20 件海生烏魚卵巢樣品中有 11 件烏魚卵巢樣品檢測到雌激素，檢出率為 55%，檢出雌二醇含量為 0.005~0.010 mg/kg，詳見 (表十一)。

(二) 洄游烏魚之雌激素含量

分析 2019 年 12 月由國立臺灣海洋大學自彰化採集之 20 件洄游烏魚樣品，洄游烏魚樣品再細分為洄游烏魚肉 20 件、洄游烏魚肝 20 件及洄游烏魚卵巢 19 件。

雌激素含量檢測結果顯示如下：

1. 烏魚肉：20 件洄游烏魚肉樣品中皆未檢出雌激素 (< LOQ)。
2. 烏魚肝：1 件雄性洄游烏魚肝樣品中未檢出雌激素 (< LOQ)；19 件雌性洄游烏魚肝樣品中有 19 件烏魚肝樣品檢測到雌激素，檢出率為 100%，檢出雌二醇

表十一、雌激素烏魚樣品分析結果

Table 11. Estrogen residues detected in mullet samples

Type of sample	No. of samples	Analytes	No. of samples with residue	The detection rate (%)	The detection range (mg/kg)
Mullet liver(Female)					
Marine mullet	20	Estradiol	11	55	0.005~0.010
		Estradiol	19	100	0.013~0.229
Migrating mullet	19	Estrone	5	26	0.007~0.027
		Estriol	1	5	0.010
Mullet ovaries					
Marine mullet	20	Estradiol	11	55	0.005~0.010
Migrating mullet	19	Estradiol	1	5	0.007

含量為 0.013~0.229 mg/kg、雌酮含量為 0.007~0.027 mg/kg 及雌三醇含量為 0.010 mg/kg，其中 26% 同時檢出兩種以上雌激素，因雌二醇可代謝為活性相對較低的雌酮和雌三醇，在 1 件雌性洄游烏魚肝樣品同時檢出雌二醇 0.229 mg/kg、雌酮 0.027 mg/kg 及雌三醇 0.010mg/kg，另 4 件雌性洄游烏魚肝樣品同時檢出雌二醇 0.073~0.156 mg/kg 及雌酮 0.007~0.010 mg/kg。

3. 烏魚卵巢：19 件洄游烏魚卵巢樣品中有 1 件烏魚卵巢樣品檢測到雌激素，檢出率為 5%，檢出雌二醇含量為 0.007 mg/kg，詳見表十一。

三、海生烏魚及洄游烏魚雌激素含量之探討

(一)烏魚雌激素含量之探討

綜合 20 件海生烏魚及 20 件洄游烏魚

樣品中，包含烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢各組織部位，雌激素含量檢測的結果顯示，其檢出藥劑主要為雌二醇、雌酮及雌三醇，其中以雌二醇檢出率為最高，依序為雌酮及雌三醇，其檢出組織部位主要為烏魚肝及烏魚卵巢，其中以雌性烏魚肝檢出率為最高。

(二)雌性烏魚雌激素含量與生殖腺指數 (Gonadosomatic index) 之探討

生殖腺指數 (Gonadosomatic index, GSI)，又稱性腺指數，為性成熟度的一個指標，其計算方法為 $GSI = (\text{生殖腺重量} / \text{魚體重}) \times 100$ ，計算 20 件雌性海生烏魚及 19 件雌性洄游烏魚之 GSI 值，如下：

1. 海生烏魚：20 件雌性海生烏魚之 GSI 值，有 7 件 (35%) GSI 值在 1~5 之間，有 7 件 (35%) GSI 值在 5~10 之間，有 5 件 (25%) GSI 值在 10~15 之間，只有 1 件 (5%) GSI 值為 >15。

2. 洄游烏魚：19 件雌性洄游烏魚之 GSI 值，有 8 件 (42%) GSI 值在 10~15 之間，有 11 件 (55%) GSI 值>15。

20 件雌性海生烏魚中有 14 件 (70%) GSI 值在 1~10 之間，19 件 (100%) 雌性洄游烏魚之 GSI 值皆>10，詳見 (表十二)，同時依據 20 件雌性海生烏魚及 19 件雌性洄游烏魚雌激素含量檢測的結果顯示，烏魚肝雌激素之檢出率為洄游烏魚>海生烏魚，烏魚卵巢雌激素之檢出率為海生烏魚>洄游烏魚，因洄游烏魚樣品所採樣之時間為烏魚之生殖季節，其卵黃調控機制下雌魚卵巢合成雌性素，而雌性素促進肝細胞在肝臟中合成和分泌卵黃生成素，並反饋於大腦和垂體以控制卵黃合成和成熟^(4, 11, 18, 44)，生殖季節時雌魚之 GSI 值較大且卵巢趨於成熟，雌魚卵巢不再需要合成雌性素，且雌魚肝臟中亦已有足夠之雌性素促進肝細胞在肝臟中合成和分泌卵黃生成素。

(三)雌二醇含量之盒鬚圖

依據雌二醇含量檢測之結果，進行雌性烏魚肝之盒鬚圖分析，求出雌二醇含量

分別在雌性烏魚肝及烏魚卵巢之最大值、最小值、中位數、第一四分位以及第三四分位數等統計量。

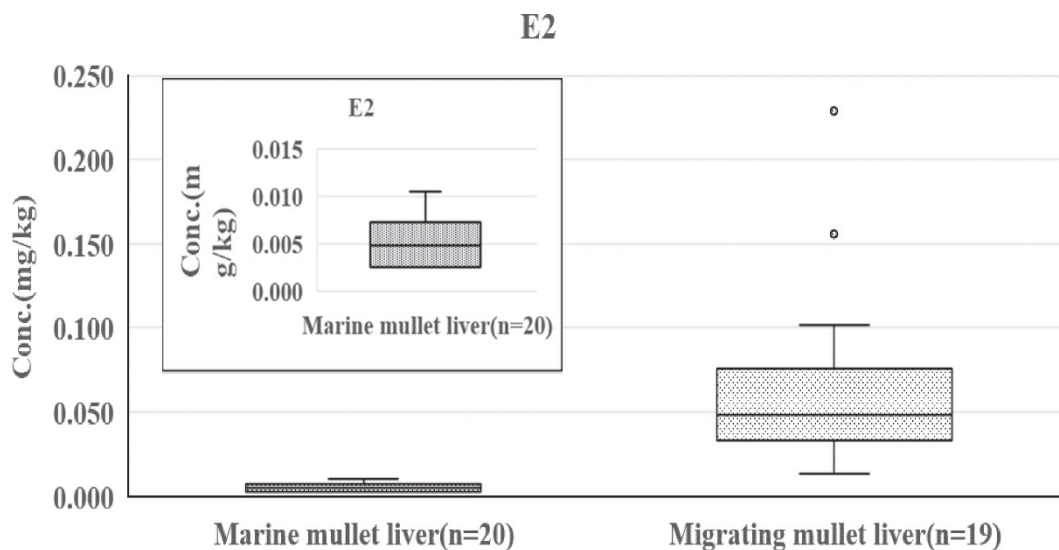
依據雌二醇在 20 件雌性海生烏魚肝 (marine mullet liver) 及 19 件雌性洄游烏魚肝 (migrating mullet liver) 樣品中含量檢測之結果，其中 N. D. (Not Detected, 未檢出) 以 1/2 LOQ 值表示，因雌二醇在烏魚肝之 LOQ 為 0.005 mg/kg，故 1/2 LOQ = 0.0025 mg/kg (四捨五入後為 0.003 mg/kg)，進行盒鬚圖分析，如 (圖三) 所示，雌性海生烏魚肝沒有離群值，而雌性洄游烏魚肝有 2 個離群值，分別為 0.156 及 0.229 mg/kg，因生物體間個體差異性，故本研究不探討離群值，則雌二醇在雌性烏魚肝之最小值及最大值數據，在雌性海生烏魚肝為 0.003 及 0.010 mg/kg 及雌性洄游烏魚肝為 0.013 及 0.102 mg/kg；盒鬚圖中盒子大小表示分散程度，盒子表示 50% 雌二醇在雌性烏魚肝之數據，其在雌性海生烏魚肝為 0.003 ~ 0.007 mg/kg 及雌性洄游烏魚肝為 0.033 ~ 0.076 mg/kg；盒中黑線表中位數，其在雌性海生烏魚肝為 0.005 mg/kg 及雌性洄游烏魚肝為 0.049 mg/kg。

表十二、雌性海生烏魚及雌性洄游烏魚之生殖腺指數範圍

Table 12. Range of GSI values detected in marine mullet and migrating mullet

Type of sample	Sampling time	No. of sample (Percentage of sample number, %)			
		GSI 1~5	GSI 5~10	GSI 10~15	GSI over 15
Marine mullet ¹⁾	201910	7 (35)	7 (35)	5 (25)	1 (5)
Migrating mullet ¹⁾	201912	0	0	8 (42)	11 (58)

¹⁾ 國立臺灣海洋大學水產養殖學系沈士新老師提供海生烏魚及洄游烏魚之 GSI 值。



圖三、雌二醇在不同雌性烏魚肝分析結果之盒鬚圖。

Fig. 3. Box plot illustrating Estradiol (E2) residues in livers from marine mullet and migrating mullet.

結論與建議

本研究建立以 QuEChERS 方法搭配液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS)，同時分析烏魚肉、烏魚肝及烏魚卵巢中 7 種雌激素之分析方法，此分析方法具靈敏度及檢測效率，可準確鑑別雌激素，簡短分析流程，回收率及再現性均佳，可應用於例行性之檢驗工作，並提供烏魚安全生產管理相關研究計畫之應用。

謝辭

本研究承蒙行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 108 年農科-9.4.3-藥-P1 計

畫及漁業署 108 年農科-9.4.3-漁-F1 計畫經費補助，國立臺灣海洋大學水產養殖學系沈士新老師提供樣品，及本所殘毒管制組林鳳宜小姐、李麗茹小姐、陳麗雯小姐等協助試驗進行，謹此致謝。

引用文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。2008。動物用藥品資訊服務網。檢自 <https://amdrug.baphiq.gov.tw/Animal/AMItem4.aspx> (Nov. 13, 2020)
2. 林玉婕。2010。雌激素新興污染物於河川底泥中吸附特性之探討。國立屏東科技大學環境工程與科學研究所碩士論文。屏東。81 頁。

3. 郭仁杰。2001。烏魚養殖。雲嘉地區主要魚貝類繁養殖技術彙集，第 37-54 頁。劉富光等著。行政院農業委員會水產試驗所臺西分所。雲林。
4. 張清風。2005。水產養殖：魚類性別轉變的奧妙。科學發展 385：18-21。
5. 張惟翔。2014。臺灣烏金。農政與農情 269：67-69。
6. 陳家揚。2007。液相層析／質譜儀的基質效應與因應之道。Chemistry 65: 151-155.
7. 衛生福利部。2019。預告訂定「食品中動物用藥殘留量檢驗方法－荷爾蒙類多重殘留分析」草案。衛授食字第 1081901921 號。
8. 衛生福利部。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。2013 年 9 月 9 日第 2 次修正。
9. 衛生福利部。2019。動物用藥殘留標準。衛授食字第 1081302402 號令修正。
10. 鄭惠文。2004。利用固相萃取與液相層析／質譜／質譜儀分析水中的雌素酮、天然動情激素、乙炔動情激素與雌素醇之方法開發。國立臺灣大學環境衛生研究所碩士論文。臺北。67 頁。
11. Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., and Yang, Y. 2017. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. Environ. Int. 99: 107-119.
12. Anastassiades, M., Scherbaum, E., Taşdelen, B., and Štajnbaher, D. 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis, pp. 439-458. In: Ohkawa, H., Miyagawa, H., and Lee, P. W. [eds.], Pesticide chemistry. crop protection, public health, environmental safety. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 538 pp.
13. Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., and Samperi, R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environ. Sci. Technol. 34: 5059-5066.
14. Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J., and Cofino, W. P. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Sci. Total Environ. 225: 101-108.
15. Chang, C. W., Iizuka, Y., and Tzeng, W. N. 2004. Migratory environmental history of the grey mullet *Mugil cephalus* as revealed by otolith Sr: Ca ratios. Mar. Ecol. Prog. Ser. 269: 277-288.
16. Codex Alimentarius Commission. 2018. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CX/MRL 2-2018.
17. Croley, T. R., Hughes, R. J., Koenig, B. G.,

- Metcalf, C. D., and March, R. E. 2000. Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 14: 1087-1093.
18. Dang, Z. 2016. Interpretation of fish biomarker data for identification, classification, risk assessment and testing of endocrine disrupting chemicals. *Environ. Int.* 92-93: 422-441.
19. de Vlaming, V., Biales, A., Riordan, D., Markiewicz, D., Holmes, R., Otis, P., Zander, R., and Lazorchak, J. 2007. Screening California surface waters for estrogenic endocrine disrupting chemicals (EEDC) with a juvenile rainbow trout liver vitellogenin mRNA procedure. *Sci. Total Environ.* 385: 66-79.
20. Ferguson, P. L., Iden, C. R., McElroy, A. E., and Brownawell, B. J. 2001. Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-Electrospray-MS. *Anal. Chem.* 73: 3890-3895.
21. Fiers, T., Casetta, B., Bernaert, B., Vandersypt, E., Debock, M., and Kaufman, J. M. 2012. Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-894: 57-62.
22. Guedes-Alonso, R., Sosa-Ferrera, Z., and Santana-Rodríguez, J. J. 2017. Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 237: 1012-1020.
23. He, Z., Wang, L., Peng, Y., Luo, M., Wang, W., and Liu, X. 2015. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food Chem.* 169: 372-380.
24. Huang, C. H., and Sedlak, D. L. 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 133-139.
25. Hu, Y., Wang, Y., Chen, X., Hu, Y., and Li, G. 2010. A novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber coupled with high performance liquid chromatography for analysis of trace estrogens in fishery samples. *Talanta* 80: 2099-2105.
26. BSI Standards Limited. 2018. European Standard. Foods of plant origin-Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive

- SPE-Modular QuEChERS-method. EN 15662: 2018.
27. Jiang, T., Zhao, L., Chu, B., Feng, Q., Yan, W., and Lin, J. M. 2009. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17beta-estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. *Talanta* 78: 442-447.
28. Johnson, A. C., Belfroid, A., and Di Corcia, A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* 256: 163-173.
29. Kelly, C. 2000. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 872: 309-314.
30. King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., and Olah, T. 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11: 942-950.
31. Kloepfer, A., Quintana, J. B., and Reemtsma, T. 2005. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr. A.* 1067: 153-160.
32. Laganà, A., Bacaloni, A., Fago, G., and Marino, A. 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14: 401-407.
33. Lehotay, S. J., Son, K. A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., and Leepipatiboon, N. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A.* 1217: 2548-2560.
34. López de Alda, M. J., and Barceló, D. 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 892: 391-406.
35. López de Alda, M. J., and Barceló, D. 2001. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. *J. Chromatogr. A.* 911: 203-210.
36. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., and Chavez-Eng, C. M. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-

- MS/MS. Anal. Chem. 75: 3019-3030.
37. Mueller, S. O. 2004. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. Anal. Bioanal. Chem. 378: 582-587.
38. Niessen, W. M. A. 2006. Atmospheric-pressure ionization. In liquid chromatography-mass spectrometry, 3rd ed. Taylor & Francis Group. 141 pp.
39. Official Journal of the European Communities. 2002. Commission decision. 2002/657/EC.
40. Oh, S. M., Kim, H. R., Park, H. K., Choi, K., Ryu, J., Shin, H. S., Park, J. S., Lee, J. S., and Chung, K. H. 2009. Identification of estrogen-like effects and biologically active compounds in river water using bioassays and chemical analysis. Sci. Total Environ. 407: 5787-5794.
41. Pan, B. S., Sheen, S. S., Shew, S. H., Chen, C. M., and Hung, J. 1992. Difference in sex ratio and physiological indices of cultured and wild grey mullet (*Mugil cephalus*) in Taiwan. Nippon Suisan Gakkaishi 58: 1229-1235.
42. Pesek, J. J., and Matyska, M. T. 2015. Ammonium fluoride as a mobile phase additive in aqueous normal phase chromatography. J. Chromatogr. A. 1401: 69-74.
43. Shishida, K., Echigo, S., Kosaka, K., Tabasaki, M., Matsuda, T., Takigami, H., Yamada, H., Shimizu, Y., and Matsui, S. 2000. Evaluation of advanced sewage treatment processes for reuse of wastewater using bioassays. Environ. Technol. 21: 553-560.
44. Sullivan, C. V., and Yilmaz, O. 2018. Vitellogenesis and yolk proteins, fish, pp. 266-277. In: M. K. Skinner [ed.], Encyclopedia of reproduction. Academic Press. 3868 pp.
45. Takkis, K., Aro, R., Kõrgvee, L. T., Varendi, H., Lass, J., Herodes, K., and Kipper, K. 2017. Signal enhancement in the HPLC-ESI-MS/MS analysis of spironolactone and its metabolites using HFIP and NH₄F as eluent additives. Anal. Bioanal. Chem. 409: 3145-3151.
46. Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., and Servos, M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Sci. Total Environ. 225: 81-90.
47. Wang, W., and Cole, R. B. 2009. Enhanced collision-induced decomposition efficiency and unraveling of fragmentation pathways for anionic adducts of brevetoxins in negative ion electrospray mass spectrometry. Anal. Chem. 81: 8826-8838.
48. Wang, H., Zhou, X., Zhang, Y., Chen, H., Li, G., Xu, Y., Zhao, Q., Song, W., Jin, H., and Ding, L. 2012. Dynamic microwave-

- assisted extraction coupled with salting-out liquid-liquid extraction for determination of steroid hormones in fish tissues. *J. Agric. Food Chem.* 60: 10343-10351.
49. Witting, M., Rudloff, H. C., Thondamal, M., Aguilaniu, H., and Schmitt-Kopplin, P. 2015. Fast separation and quantification of steroid hormones Δ^4 - and Δ^7 -dafachronic acid in *Caenorhabditis elegans*. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 978-979: 118-121.
50. Xu, C. L., Chu, X. G., Peng, C. F., Jin, Z. Y., and Wang, L. Y. 2006. Development of a faster determination of 10 anabolic steroids residues in animal muscle tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 616-621.

Multiresidue Analysis of Estrogens in Mullet

Hui-Shan Chen¹, Horng-Ji Chen², Tsy-Horng Shyu^{1*}

Abstract

Chen, H. S., Chen, H. J., and Shyu, T. H. 2020. Multiresidue analysis of estrogens in mulle. Taiwan Pestic. Sci. 9: 55-75.

In this study, we developed a novel method (based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) to analyze mullet muscle, mullet liver, and mullet ovaries for the following estrogen residues: Estrone (E1), 17 α -Estradiol (17 α -E2), Estradiol (E2), Estriol (E3), Diethylstilbestrol (DES), Ethinylestradiol (EE), and Estradiol benzoate (EB). Specifically, we first performed a triple recovery test by adding three concentrations to mullet muscle, mullet liver and mullet ovaries. We then purified and extracted estrogen residues using the QuEChERS procedure and analyzed resulting test solutions qualitatively and quantitatively via LC-MS/MS. Average recovery rates for the seven kinds of estrogen ranged from 67% to 116% in mullet muscle, 61% to 113% in mullet liver, and 60% to 99% in mullet ovaries. For all average recovery rates, coefficient of variation were <20%. The limit of quantitation for each estrogen was 0.002 mg/kg in mullet muscle, 0.005 mg/kg in mullet liver, and 0.005 mg/kg in mullet ovaries. Our proposed method could be applied to the routine monitoring of estrogen residues in mullet tissues, including mullet muscle, mullet liver and mullet ovaries. In this study, we also determined the types and background concentrations of estrogen in marine mullet and migrating mullet. These results could be used as reference values in future research applications.

Key words: mullet, estrogen, LC-MS/MS

Accepted: January 29, 2021.

* Corresponding author, E-mail: ths@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

² National Chung Hsing University, Taichung